Aus der physiologisch-chemischen Anstalt der Universität Basel
Vorsteher: Prof. Dr. K. Spiro

Versuche über Permeabilität der Froschhaut

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Salomon Wowsi
aus Dünaburg (Lettland)

Leipzig
Verlag von Gebrüder Borntraeger
1931

Von der medizinischen Fakultät der Universität Basel genehmigt
auf Antrag von Professor Dr. K. Spiro.

Tag der Promotion: 4. März 1931.

Sonderabdruck aus „Protoplasma“ Internationale Zeitschrift für physikalische Chemie
des Protoplasten, Band XIV 1931

Aus der physiologisch-chemischen Anstalt der Universität Basel
Vorsteher: Prof. Dr. K. Spiro

Versuche über Permeabilität der Froschhaut

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Salomon Wowsi
aus Dünaburg (Lettland)

Leipzig
Verlag von Gebrüder Borntraeger
1931

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

I.

Die Froschhaut besitzt die Eigenschaft, viele Stoffe nur in einer Richtung durchtreten zu lassen; sie ist „irreziprok" permeabel und ist deshalb schon von vielen Autoren untersucht worden.

Grundlegende Untersuchungen wurden von E. Wertheimer angestellt. Insbesondere aber hat R. Keller versucht, auf Grund seiner Erfahrungen über Vitalfärbung die Erscheinung elektrostatisch zu deuten. Besteht nämlich zwischen den beiden Seiten der Haut ein elektrisches Potentialgefälle, so kann ein elektrisch geladenes Teilchen nur in einer Richtung die Haut durchdringen, mit dem Gefälle oder gegen das Gefälle, je nach dem Vorzeichen seiner Ladung. Der Potentialunterschied zwischen den beiden Seiten der Froschhaut hat die Größenordnung von einigen Centivolt, und zwar ist in Ringerlösung die Außenseite positiv gegen die Innenseite. Wenn man nun ferner bedenkt, daß dieser Potentialsprung an einer mikroskopisch dünnen Schicht sitzen kann, daß also in mikroskopischen Dimensionen eine hohe Feldstärke besteht, so versteht man, daß die Haut auf geladene Teilchen eine aktive Triebkraft ausübt. Unveröffentlichte Untersuchungen am hiesigen Institut (Dr. F. Leuthardt) haben gezeigt, daß dieses Potential durch alle Stoffe stark, aber reversibel herabgesetzt werden kann, welche die Lebenstätigkeit der Zellen vermindern: Alkohole, Narcotica, Schwefelwasserstoff, Zyanwasserstoffsäure (vgl. Ergebnisse der Physiologie **30**, 303). Das Potential der Haut hängt also eng mit der Lebenstätigkeit zusammen. Es liegt nahe, dasselbe auch für die Permeabilität anzunehmen. Es handelt sich bei der Permeabilität nicht bloß um die

Struktur und mechanischen Eigenschaften der Haut (Porengröße, Quellungszustand, Lipoidgehalt, Mosaikstruktur usw.), sondern um eine aktive Tätigkeit des lebenden Gewebes. Das ist die Ansicht der meisten heutigen Physiologen.

In diesem Sinne spricht sich auch E. Wertheimer in seiner Arbeit über irreziproke Permeabilität aus, wenn er aus den Beobachtungen über die verschieden ausfallenden Einwirkungen von Ionen auf die Durchlässigkeit der überlebenden Froschhaut für verschiedene Stoffe nicht ohne weiteres folgern will, daß eine Substanz die Permeabilität steigert oder herabsetzt, d. h. den Permeabilitätsvorgang direkt beeinflußt, sondern darin eine durch eine neue Wirkung herbeigeführte Verschiebung bzw. Störung des unter den bestehenden Bedingungen herrschenden Durchlässigkeitszustandes sieht.

Anknüpfend an die erörterten Thesen und die erwähnte Arbeit von F. Leuthardt habe ich die vorliegende Untersuchung unternommen, in der Absicht zu prüfen, wie sich die Durchlässigkeit für einen lipoidlöslichen Farbstoff wie Methylenblau verhält, wenn die vitale Aktivität der Zelle beeinflußt wird.

Es lag uns daran zu ermitteln, wieweit dem von R. Höber in seinen Auseinandersetzungen über die Lipoidtheorie der Vitalfärbung zur Erklärung der Durchlässigkeit der lipoidlöslichen Stoffe aufgestellten Begriff der passiven Permeabilität Allgemeingültigkeit zukommt. Versuche, die wir mit NaCN anstellten, sowie solche, die zur Erklärung der NaCN-Wirkung ausgeführt worden sind, haben Resultate geliefert, die die Durchlässigkeit für lipoidlösliche Stoffe unter einem andern Gesichtspunkt erscheinen lassen, als dem einer passiven physikalischen Permeabilität.

II.

Wir gingen von der Methodik, die E. Wertheimer angibt, aus, modifizierten sie insofern als wir für unsere Farbstoffversuche, die auf quantitative Ergebnisse hinzielten, nicht die ungeeignete Schenkelhaut, sondern die ganze Rumpfhaut benutzten.

Die mit Schere und Pinzette schnell und sorgfältig abgezogene Rumpfhaut möglichst frischer und großer Frösche wird, ohne übermäßig gedehnt und gezerrt zu werden, auf den leicht gestoßenen Rand eines Zylinderglases von etwa 3 cm Durchmesser und 6—7 cm Höhe aufgespannt und aufgebunden. Das mit der Membran bespannte Zylinderglas wird mit Hilfe einer Fadenschlinge in ein Gefäß hineingehängt,

in das wir soviel Flüssigkeit „Außenflüssigkeit", eingießen, bis sie das Niveau der Innenflüssigkeit im Zylinder erreicht.

Dem Einwand, ein solcher Abschluß sei undicht, können wir entgegenhalten, daß die Innenflüssigkeit selbst bei längerer Versuchsdauer vollständig klar, ungefärbt bleibt, wenn die physiologische Außenseite der Haut der Farbstofflösung zugekehrt ist, der Farbstoff also in der Richtung von außen nach innen permeieren soll. Dies ist ein Beweis dafür, daß der Abschluß dicht ist.

III.

Die ersten Versuche erstreckten sich auf die Prüfung der Einwirkung von NaCN auf den Durchtritt von Methylenblau.

Als Außenflüssigkeit diente uns in allen Versuchen eine 0,5 promillige Lösung von Methylenblau in 0,65 proz. NaCl-Lösung, als Innenflüssigkeit eine 0,65 proz. NaCl-Lösung. Bei den CN-Versuchen setzten wir zur Farbstofflösung bzw. zur Innenflüssigkeit so viel von einer vorrätigen NaCN-Lösung hinzu, daß ihr Gehalt an CN' der einer $^{n}/_{500}$ NaCN-Lösung entsprach.

Wir sind in diesem und allen übrigen Versuchen so vorgegangen, daß wir gleichzeitig Parallelversuche ohne NaCN anstellten, deren Ergebnisse wir als Normalwerte betrachteten.

Die Menge des permeierten Farbstoffes läßt sich mit Hilfe von Methylenblau-Vergleichslösungen in Konzentrationen von $^{1}/_{100\,000}$, $^{1}/_{200\,000}$, $^{1}/_{400\,000}$ kolorimetrisch bestimmen. Die in allen Tabellen angeführten Zahlen geben die permeierte Farbstoffmenge in mg pro dm^2/St. an. Die Bestimmung der Flächen haben wir so vorgenommen, daß wir die Umrisse der Zylindergläser auf Papier auftrugen und daraus die Flächen der entsprechenden Kreise bestimmten.

Wir konnten bestätigen, daß, wenn die physiologische Außenseite dem Farbstoff zugekehrt ist, kein Durchtritt desselben stattfindet, auch dann nicht, wenn die Farbstofflösung oder die Innenflüssigkeit CN'-haltig war. Wir haben daher keine Versuche über die Wanderung von außen gegen innen mehr gemacht, sondern allein die physiologische Innenseite wurde — entsprechend den Wertheimerschen Normalversuchen — dem Farbstoff zugekehrt. Es ergab sich nun, wie aus der Tabelle I ersichtlich ist, daß in allen Versuchen beträchtlich weniger Methylenblau permeiert, wenn die Innenseite gleichzeitig von NaCN umspült wird, oder wenn der Farbstoff in

der Richtung von innen nach außen gegen die Außenseite umspülende CN'-haltige Flüssigkeit transportiert werden soll. Eine Abweichung fiel uns in einem der Versuche auf, bei dem wir verschiedene Stücke besonders großer Froschhäute verwendeten, während wir sonst ganze Häute für jedes Glas benutzten. Es stellte sich heraus, daß es für das Versuchsergebnis nicht gleichgültig ist, welche Teile derselben Haut zur Anwendung kommen. So zeigte sich, wie dem Versuche 6 aus der Tabelle I zu entnehmen ist, daß die Durchlässigkeit eines mit NaCN in Berührung stehenden Hautteiles einen größeren Wert aufweist, als dieselbe unter normalen Bedingungen. Dies rührt aber daher, daß bei diesem Versuch verschiedene Teile der Haut (Bauch- und Rückenhaut) untersucht wurden. Wir haben daher, von dieser Beobachtung ausgehend, in sämtlichen weiteren Versuchen Rückenhaut und Bauchhaut gesondert untersucht. Die Tabelle I zeigt deutlich die Unterschiede; es sei jedoch hier bemerkt, daß dieser nur bei frischen Fröschen zu bestehen scheint, bei den Häuten ausgehungerter Frösche kann er sich verwischen.

Tabelle I

Nr.	I	II	III	IV	Versuchsdauer in Std.	II a	III a	IV a	Bemerkungen Permeabilitätsrichtung: innen → außen
1	0,223	0,098	0,2		2	43,9	89,6		
2	0,15	Spuren	0,07		2		46,6		
3	0,1	0,034	0,034		3	34,0	34,0		
4	0,06	0,031	0,039	0,014	2	51,6	65,0	23,3	*) 3 T. ein und
5	0,1	0,041	0,043	0,05	3	41,0	43,0	50,0	derselben Haut
6	0,144	0,073*)	0,026[1])	0,045*)	3	50,7	18,0	31,2	[1]) 2 T. ein und
		0,2*)	0,042[1])			138,8	29,1		derselben Haut
7	0,265	0,086	0,08		2,5	32,4	30,1		Rückenhaut
	0,89	0,216	0,149			24,4	17,1		Bauchhaut
8	0,119	0,022	0,015		2,5	18,5	12,6		Rückenhaut
	0,33	0,116	0,025			35,1	7,5		Bauchhaut
9	0,091	0,02	0,028		2,5	22,0	30,7		Rückenhaut
	0,385	0,066	0,053			17,1	13,7		Bauchhaut
10	0,016	—	—		2,5	—	—		Rückenhaut
	0,11	0,093	0,018			89,0	16,6		Bauchhaut

Erklärungen zur Tabelle I:

I. Innenflüssigkeit: 0,65 proz. NaCl-Lösung. Außenflüssigkeit: $^1/_{2000}$ M-blau in 0,65 proz. NaCl-Lösung.

II. Innenflüssigkeit: wie bei I. Außenflüssigkeit: $^n/_{500}$ NaCN in $^1/_{2000}$ M-blau in 0,65 proz. NaCl-Lösung.

III. Innenflüssigkeit: $^n/_{500}$ NaCN in 0,65 proz. NaCl-Lösung. Außenflüssigkeit: wie bei I.

IV. Innenflüssigkeit: wie bei III. Außenflüssigkeit: wie bei II.

IIa, IIIa, IVa. Prozentische Änderung der Durchlässigkeit, bezogen auf die Zahlen der Kolonne I als 100 %.

Zur bessern Übersicht sind die Werte der Tabelle in der beigegebenen Figur dargestellt.

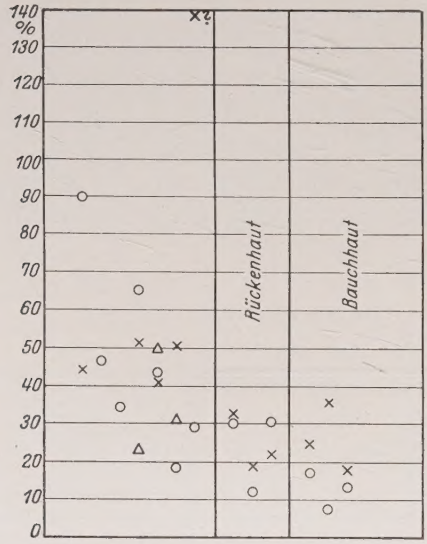

Fig. I.
Normale Durchlässigkeit innen → außen = 100 %.
× Durchlässigkeit bei Gegenwart von $^n/_{500}$ NaCN auf der physiol. Innenseite.
○ Durchlässigkeit bei Gegenwart von $^n/_{500}$ NaCN auf der physiol. Außenseite.
△ Durchlässigkeit bei Gegenwart von $^n/_{500}$ NaCN auf beiden Seiten der Membran. (Punkte mit derselben Abszisse gehören zur gleichen Versuchsreihe.)

Durch Kontrollversuche mit N/500 NaOH haben wir uns vergewissert, daß es nicht die alkalische Reaktion des NaCN gewesen ist, die die Durchlässigkeitsherabsetzung bewirkt hat.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Tabellen II und III zusammengestellt.

Tabelle II

Nr.	I	II	III	Versuchsdauer in Std.	IIa	IIIa	Bemerkungen Transportrichtung: innen → außen
1	0,112	0,025	0,118	3	22,3	105,3	Rückenhaut
	0,243	0,093	0,408		38,6	167,0	Bauchhaut
2	0,131	0,083	0,223	3	63,3	170,0	Rückenhaut
	0,188	0,162	0,327		86,0	173,9	Bauchhaut

Erklärungen zur Tabelle II:

I. Innenflüssigkeit: 0,05 proz. NaCl-Lösung. Außenflüssigkeit: $^1/_{2000}$ M-blau in 0,65 proz. NaCl-Lösung.

II. Innenflüssigkeit: wie bei I. Außenflüssigkeit: $^n/_{500}$ NaCN in $^1/_{2000}$ M-blau- in 0,65 proz. NaCl-Lösung.

III. Innenflüssigkeit: wie bei I. Außenflüssigkeit: $^n/_{500}$ NaOH in $^1/_{2000}$ M-blaulös. in 0,65 proz. NaCl-Lösung.

IIa, IIIa. Prozentische Änderungen der Durchlässigkeit bezogen auf die Zahlen der Kolonne I als 100 %.

Tabelle III

Nr.	I	II	III	IV	V	Versuchsdauer in Std.	IIa	IIIa	IVa	Va	Bemerkungen Transportrichtung: innen → außen
1	0,160	0,075	0,159			3	47,8	99,5			Rückenhaut
	0,384	0,131	0,301				34,0	78,4			Bauchhaut
2	0,158			0,044	0,05	3			27,7	31,6	Rückenhaut
	0,281			0,111	0,137				39,5	48,7	Bauchhaut

Erklärungen zur Tabelle III.

I. Innenflüssigkeit: 0,65 proz. NaCl-Lösung. Außenflüssigkeit: $^1/_{2000}$ M-blau in 0,65 proz. NaCl-Lösung.

II. Innenflüssigkeit: $^n/_{500}$ NaCN in 0,65 proz. NaCl-Lösung. Außenflüssigkeit: wie bei I.

III. Innenflüssigkeit: $^n/_{500}$ NaOH in 0,65 proz. NaCl-Lösung. Außenflüssigkeit: wie bei I.

IV. Innenflüssigkeit: wie bei II. Außenflüssigkeit: $^n/_{500}$ NaCN in M-blau- in 0,65 proz. NaCl-Lösung.

V. Innenflüssigkeit: wie bei III. Außenflüssigkeit: $^n/_{500}$ in $^1/_{2000}$ M-blau in 0,65 proz. NaCl-Lösung.

IIa, IIIa, IVa, Va. Prozentische Änderung der Durchlässigkeit bezogen auf die Zahlen der Kolonne I als 100 %.

In einem weiteren in dicht schließenden Gefäßen vorgenommenen Versuch, haben wir durch Zusatz von einer äquivalenten Menge HCl zur NaCN-haltigen Farbstofflösung die HCN-Säure freigemacht. Die Mengen des permeierten Farbstoffes blieben auch hier unter der des normalen Parallelversuches:

Innenflüssigkeit: 0,65 proz. NaCl-Lösung.

Außenflüssigkeit:	$^1/_{2000}$ Methylblaulösung in 0,65 proz. NaCl-Lösung.	$^n/_{500}$ NaCN $^1/_{2000}$ M-blau in 0,65 proz. NaCl-Lösung.	$^n/_{500}$ NaCN in $^1/_{2000}$ M-blau in 0,65 proz. NaCl-Lösung + HCl.
	0,164	0,1	a) 0,125 b) 0,145
	0,297	0,174	0,182 0,165
	100 %	60,9 %	76,2 % 88,4 %
	100 %	58,5 %	61,2 % 55,9 %

Es zeigt sich also, daß die Herabminderung der Permeabilität parallel geht mit der Eingangs erwähnten Verminderung des Potentials. Das Bemerkenswerte am Resultat ist die Tatsache, daß die Permeabilität durch das starke Zellgift NaCN vermindert werden kann; während man sonst gewohnt ist, bei Schädigung eine Erhöhung zu beobachten. Die einfachste Deutung scheint uns die zu sein, daß die „Permeabilität" für das Methylenblau auf bestimmte durch die Tätigkeit der Zelle bedingten Strukturdifferenzen beruht, und deshalb durch geeignete Mittel herabgesetzt werden kann, wenn man dabei tiefgreifende Schäden vermeidet.

IV.

Die oben erwähnten nicht publizierten Untersuchungen von Dr. F. Leuthardt am hiesigen Institut über das Potential der Froschhaut haben ferner ergeben, daß auch durch Sauerstoffentzug das Potential reversibel herabgesetzt werden kann. Wir haben deshalb auch versucht, durch Entzug von Sauerstoff eine Verminderung der Methylenblaupermeabilität zu erzielen. Diese Versuche verliefen resultatlos. Es zeigte sich keine Verminderung, sondern eine Vergrößerung. Es ist natürlich die Möglichkeit gegeben, daß zwar anfänglich eine Verminderung stattfindet, daß aber die Haut im Verlauf des Versuches irreversibel geschädigt und deshalb durchlässig wird. Es sind viele Beobachtungen bekannt, daß durch Schädigung die Permeabilität erhöht wird (vgl. z. B. Lucké und McCutcheon, 1930).

Für diese Versuche wurden Lösungen und Gefäße durch einen über glühende Cu-Späne geleiteten N_2-Strom jedesmal möglichst sauerstofffrei gemacht, außerdem der Exsikator, in den die Gläser während des Versuchs eingehängt wurden, mit Stickstoff durchströmt. Eine absolute Entfernung des Sauerstoffs ließ sich jedoch schwer erzielen, weil das Einpipettieren der Innenflüssigkeit, sowie das Aufspannen der Haut

nicht in einer N_2-Atmosphäre ausgeführt werden kann. Dennoch war der Effekt von fünf Versuchen insofern eindeutig, als wir bei allen eine Steigerung der Durchlässigkeit feststellen konnten. Allein diese Ergebnisse beziehen sich auf die Transportrichtung von innen, nach außen; bei einem Versuche mit einer dem Farbstoff zugekehrten Außenseite zweier Häute, d. h. in der Richtung von außen nach innen ging jedoch nichts durch: die irreziproke Eigenschaft der Haut wurde also durch den O_2-Mangel nicht aufgehoben.

Es sei in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, daß auch leblose Membranen noch eine gewisse ungleichseitige Durchlässigkeit aufweisen können. (Vgl. die Angaben bei Wertheimer, ferner Brauner, 1930. Amson, 1930 nimmt an, daß die irreziproke Permeabilität der Froschhaut nur eine Frage der Struktur ist.)

In der Tabelle IV sind die Resultate dieser Versuche zusammengefaßt.

Tabelle IV

Nr.	I	II	Versuchsdauer in Stunden	II a	Bemerkungen Transportrichtung: innen → außen
1	0,105	0,397	3	377,7	Rückenhaut
	0,175	0,481		274,9	Bauchhaut
2	0,23	0,34	1	147,7	Rückenhaut
	0,3	0,84		280,0	Bauchhaut
3	0,21 (?)	0,14	1	66,6 (?)	Rückenhaut
	0,26	0,544		209,2	Bauchhaut
4	0,198	0,219	1	110,6	Rückenhaut
	0,290	0,407		140,3	Bauchhaut
5	0,235	0,392	1	166,9	Rückenhaut
	0,31	0,83		267,7	Bauchhaut

Erklärungen zur Tabelle IV.

I. Versuche in Luft-O_2.
Innenflüssigkeit: 0,65 proz. NaCl-Lösung. Außenflüssigkeit: $^1/_{2000}$ M-blau in 0,65 proz. NaCl-Lösung.

II. Versuche in N_2-Strom.
Innenflüssigkeit: 0,65 proz. NaCl-Lösung. Außenflüssigkeit: $^1/_{2000}$ M-blau in 0,65 proz. NaCl-Lösung.

IIa. Prozentische Änderung der Durchlässigkeit bezogen auf die Zahlen der Kolonne I als 100 %.

Wir haben auch noch Versuche über den Einfluß von Wasserstoffperoxyd auf die Permeabilität angestellt. Die Irreziprozität konnte aber auch hier nicht durchbrochen werden.

Am Schluß möchte ich Herrn Dr. Leuthardt für seine freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit meinen Dank aussprechen.

Literatur-Angaben

Amson, K., Worauf beruht die irreziproke Permeabilität der Froschhaut? Pflügers Arch., **225**, 467 (1930).

Brauner, L., Untersuchungen über die Elektrolytpermeabilität und Quellung einer leblosen natürlichen Membran. Jahrb. Botanik, **73**, 513 (1930).

Höber, R., Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. 5. Aufl. Verlag W. Engelmann, Leipzig 1922.

Keller, R., Die Elektrizität in der Zelle. II. Aufl. Verlag Julius Kittls Nachfolger Keller & Co., 1925.

Lucké, B. und McCutcheon, M., The effect of injury on cellular Permeability to water. Arch. of Path., **160**, 62 (1930).

Wertheimer, E., Über irreziproke Permeabilität. Pflügers Archiv, **199**, 383 (1923), **200**, 82 und 354 (1923).